

Aneksyny są rodziną białek wiążących błony pod wpływem wapnia. Występują we wszystkich znanych organizmach eukariotycznych a obecnie wykrywa się coraz więcej prototypowych białek z tej rodziny również w bakteriach. W genomie każdego praktycznie gatunku jest zwykle kilka do kilkudziesięciu genów kodujących aneksyny, a ekspresja przynajmniej grupy zachodzi we wszystkich komórkach i tkankach na wysokim poziomie. Są badane od ponad 30 lat i o tyle o ile można już dużo powiedzieć o biologicznych funkcjach tych białek w komórkach i organizmach zwierząt niewiele wciąż wiadomo o ich roślinnych odpowiednikach. Udało się ustalić, w dużej mierze dzięki naszym dotychczasowym badaniom, że wiele z nich uczestniczy w przekazywaniu informacji w komórce i w nieznanym nadal sposób poprawia tolerancję organizmu i jego adaptację do nieoptymalnych warunków zewnętrznych.

W naszej pracy pokazaliśmy, że podwyższenie poziomu własnej aneksyny ANXD36 w ziemniaku ma konsekwencje dla fizjologii i biochemii tych roślin. Zaburzeniu uległa równowaga hormonalna, zmieniły się relatywne poziomy niektórych lipidów budujących błony fotosyntetyczne a sama fotosynteza w suszy dłużej była bardziej wydajna. Stwierdziliśmy też, że podczas stresu spowodowanego nadmiernym oświetleniem poziom akumulacji wolnych rodników tlenowych był obniżony. Sygnalizacja wolnorodnikowa jest obecnie jednym z najintensywniej badanych procesów. Źródłem wolnych rodników tlenowych są podstawowe procesy metaboliczne, a komórki roślinne w toku ewolucji nabyły zdolność rozumienia takich sygnałów i aktywowania odpowiednich procesów, tak aby zachować równowagę metaboliczną. Ponieważ często procesy te są konsekwencją działania czynników środowiska uważa się obecnie, że metabolizm wolnych rodników – ich powstawanie i neutralizacja - stanowi platformę interakcji pomiędzy procesami metabolicznymi a czynnikami środowiskowymi. W tym projekcie chcemy zbadać szczegółowo rolę aneksyny 1 w metabolizmie wolnych rodników.

W tym celu wykorzystany zostanie cały wachlarz technik, zaczynając od klasycznych badań biochemicznych przez analizy mikroskopowe i wreszcie najnowocześniejsze techniki wysokoprzepustowe. Ponieważ dane wstępne wskazują że aneksyna może regulować równowagę oksydoredukcyjną najważniejszego związku o działaniu antyoksydacyjnym – askorbinanu – będziemy badać potencjalne mechanizm tego procesu. Zbadamy zatem, czy poziom ANXD1 ma wpływ na równowagę pomiędzy formami utlenionymi i zredukowaną postacią tego związku. Zaobserwowane zależności zostaną potwierdzone *in vivo* przez badanie podwójnych mutantów o obniżonym poziomie askorbinanu i aneksyny. Rośliny te zostaną też poddane analizie ultrastrukturalnej i wreszcie określony będzie wpływ aneksyny na błonowy system transportu elektronów jako potencjalny mechanizm regeneracji askorbinianu.

W drugiej części projektu będziemy analizować, z którym ze szlaków przekazywania sygnału aneksyna może interferować. W tym celu wykorzystane będą linie *Arabidopsis*, które na skutek manipulacji genetycznych akumulują poszczególne formy wolnych rodników w postaci czystej, to znaczy bez znaczącego współdziałania innych, towarzyszących form. Dodatkowo, ta akumulacja jest indukowana, a zatem może być wywołana w dowolnym momencie i jesteśmy w stanie manipulować jej poziomem. Rośliny takie są szeroko wykorzystywane do badania roli biologicznej różnych ROS. Zostały one zmodyfikowane przez nas tak, że poziom aneksyny ANXD1 jest zwiększony. Będziemy analizować ich transkrypty metodą głębokiego sekwencjonowania RNA, tak aby stwierdzić w jaki sposób manipulacja genetyczna wpłynęła na szlak przekazywania sygnału. Badanie to będzie wykonane jako usługa zewnętrzna w laboratorium zajmującym się wyłącznie tą techniką, co gwarantuje poprawne wykonania eksperymentu. Druga, równie trudna część czyli analiza uzyskanych wyników odbędzie się we współpracy z laboratorium, gdzie jest wykonywana rutynowo.

Będziemy też badać inne aspekty biologii tych roślin, stosownie do linii, w tym szczególnie poziom poszczególnych ROS, zawartość niskocząsteczkowych antyoksydantów, aktywność enzymów neutralizujących wolne rodniki, akumulację pigmentów ochronnych, poziom barwników fotosyntetycznych i wydajność fotosyntezy w stresie silnego oświetlenia. Przeprowadzimy też analizę ekspresji genów markerowych oraz tych, których ekspresja w liniach wyjściowych była najbardziej zmieniona. Ponieważ istnieją przesłanki aby sądzić, że rośliny jednej z tych linii mają zmienioną ultrastrukturę chloroplastów zaplanowaliśmy wykonanie badań, które tę hipotezę zweryfikują.

Mamy nadzieję, że zaplanowane badanie pozwolą lepiej zrozumieć biologię aneksyn roślinnych.